

1/1



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number: 09121855

(43) Date of publication of application: 13.05.1997

(51)Int.CI.

C12N 9/52 C12N 1/20 //(C12N 9/52 C12R 1:465) (C12N 1/20 C12R 1:465)

(21)Application number: 07322535

(71)Applicant:

TOTO LTD

(22)Date of filing: 02.11.1995

(72)Inventor:

MORIYAMA YASUSHI MANSEI SHINJI

YOSHIZUMI NORISHIGE

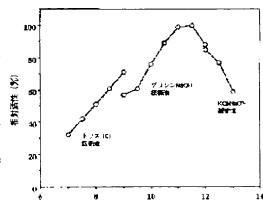
MURANO HITOMI OSAKI ARIYOSHI

(54) NEW ALKALI PROTEASE AND ITS PRODUCTION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new alkali protease having high activity not only against soluble proteins but also against insoluble proteins such as keratin.

SOLUTION: This new alkali protease has the following physicochemical characteristics; (a) action and substrate specificity: acting on various proteins such as casein, gelatin, gluten, hemoglobin and insulin to produce oligopeptides and amino acids by endo-type-hydrolyzing the peptide linkages; in particular, highly hydrolyzing even insoluble proteins such as keratin on which conventional enzymes have been hard to act.: (b) optimum pH: 11.0-11.5 in the case of casein as



143

substrate; and (c) specific activity: 214,000 (U/mg protein) for casein, and 52,700 (U/mg protein) for keratin.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998 Japanese Patent Office

MENU SEARCH INDEX

(19)日本国特許庁 (JP)

(12)公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-121855

(13)公開日 平成9年(1997)5月13日

(Stilnt. Cl. a	識別記号 庁内整理	番号 FI				技術表示箇所
C12N 9/52		C 1 2 N	9/52			X 11 X 11 E 11
1 / 2 0			1/20		A	
//(CI2N 9/52					.,	
C12R 1:46	;)					
(C12N 1:20	,					
(075. 13.50	審	查請求 未請求	請求項の数7	書面	(全8頁)	最終頁に続く
(21:出願番号	特願平7-322535	: (71)出		0 1 0 0 8	8 7	
			東陶機器	B株式会社	· +	
(22:出願日	平成7年(1995)11月2	2 日				島2丁目1番1
			号		, ,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,	
		(72)発	明者 森山 鼠	表 司		
			福岡県は	···· 七九州市/	N倉北区中.	島二丁目1番1
				国機器株式		
		(72)発!				
			福岡県は	七九州市力	小倉北区中 8	島二丁目1番1
				甸機器株式		
		(72)発				
				-	小倉北区中島	島二丁目1番1
				日機器株式		
			- '			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】新規アルカリプロテアーゼおよびその製造法

(57)【要約】

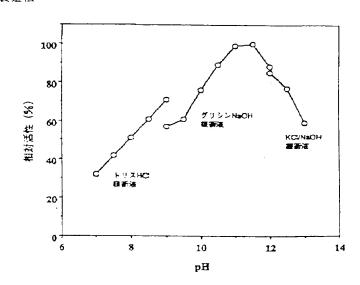
【目的】 可溶性タンパク質のみならず、ケラチンなど 〇不溶性タンパク質に対しても強力な活性を有する新規 アルカリプロデアーゼを提供する。

【構成】 下記の理化学的性質を有するアルカリプロデアーゼ。

(a) 作用および基質特異性:カゼイン、ゼラチン、 グルテン、ヘモグロビン、インシュリンなどの各種タン パク質に作用し、そのペプチド結合をエンド的に加水分解してオリゴペプチドおよびアミノ酸を生成する。特に、従来の酵素では作用し難かったケラチン等の不溶性 タンパケ質に対しても、強力に加水分解する。

(b 最適pH 最適pHはカゼインを基質とした 場合、1.1、 $0 \sim 1.1$ 、5である。

(c) 比括性 カゼインに対しては2.1.4, 0.0.0 (U/mg ϕ) 、f ϕ ϕ ϕ) 、f ϕ ϕ ϕ 0 (U/mg ϕ ϕ) である。



【特許請求の範囲】

【請求項1】下記の理化学的性質を有するアルカリプロ チアーゼ

all 作用および基質特異性:各種タンドり質およびペ プチドに特異的に作用し、そのペプチド結合をエンド型 の機作により切断して、低分子量のすりゴスプチドおよ びアミノ酸を生成する。また特に従来のプロデアーゼで は分解が困難であったケラチンなどの下溶性タンパラ質 についても高い活性を示す。

- b L 最適;H:最適pHはカゼインを基質とした場 台、11 (~11 5である。

で 安定了日:30℃、24時間の処理条件におい て、pH1.5~12.0で安定である。

id 最適温度:最適作用温度は10~13℃である。

· e · 安定温度:pH7. 0、10分間の処理条件にお いて、カルシウム無添加の場合は55℃、カルシウムを 添加した場合は60℃まで安定である。

:f: 分子量:的56,000 (SDS電気泳動法)で まる.

(g: 等電点:向10~10、5 (等電点電気泳動法) てある。

(h) 比活性:カゼインを基質とした場合は214.0 00(U/mgタンパクト、ケラチンを基質とした場合 は52, 700 (U/m g タンパラ) である。

(1) 阻害:PCMB(パラクロロマーキュリーペング エ1ト)、ヨード酢酸、EDTA (エチレンジアミン四 酢酸)では活性は阻害されないが、DFF(ジイソプロ ピレアルオロホスフェート)、PMSF (フェニルメタ ンスルフォニルマルオライド)では阻害される。

【諸式項2】好アルカリ性放線菌ストレプトミセス(S) treptomyces) 属菌から得られる、請求項1 記載のプロテアーゼ。

【請求項3】ストレプトミセス エスピー:Strep tomyces sp.) TOTO-9305株から得 られる、請求項1記載のプロデアーゼ。

【確求項4】好アルカリ性ストレプトミセス属に属し、 請求項1記載のアルカリプロデアーゼ産生能を有する微 生物を培養する工程と、該工程で得られた培養物より該 アルカープロチアーゼを分離する工程とを含んでなる。 アルカープロテアーゼの製造法。

【前で項:】前期微生物の培養が責日8、0~13、0 のアドガー性で行われる、請求項4記載の製造法。

【顔で項も】前記微生物がストレプトミセス。エスピー ↑○ ↑ () = 9 3 () 5 株である請求項目記載のプロデア 一世製造法。

【游水項で】ストレプトミセス エスピー TOTロー 93) 13株 (FERM P-13 n 4 0).

【発明点詳細な説明】

ロデアーゼおよびその製造法ならびに該アルカリプロデ アーゼ産生能を有する新規好アルカ(性放線菌に関す

[] 5 0 2]

【逆共の技術】アルカリブロデアーゼはタンパク質のペ プチド結合をアルカリ領域において特異的に加出分解す る酵素であり、食品、繊維、皮革、佐剤等の工業におい て広く利用されている。このようなアルカリプロデアー ゼは宋代菌、酵母、細菌等の微生物により広く生産され 10 ることが知られており、またいわゆる好アルカリ性激生 物と呼ばれる一群の微生物によっても生産される。

【りりり3】前述された好アルカリ性微生物から生産さ れるアルカリプロチアーゼとしては、いわゆる好アルカ り性パチルス属菌から得られる酵素(例えば、特以平7 - 6 3 3 6 6、特公平7 - 6 3 3 6 7、特公平7 - 6 3 3 6 8 等にが多数既に知られており、主に統剤用として 開発が進められている。また、同様な好アルカリ性パチ ルス属菌から得られる耐熱性酵素として、AH-101 株の生産するアルカリプロテアーゼ(特開半2-255 - 0 8 7)および B 1 3 - 1 株の生産するアルカリプロデ 20 アーゼ(特公平1-63368)等が知られている。し かしながら、同じ好アルカリ性微生物である好アルカリ 性放棄菌の産生するプロテアーゼについてはままり知る れておらず、わずかに好アルカリ性ストレブトミセス属 菌由来の酵素(Agr. Biol. Chem., 35 (1) 37-44、1974) ならびに好ア川力り性サ ーモアクチィミセス属HS683株のアルカリプロチア Htt (Biosci, Blotech, Bloche m., 5 6 (2). 2 4 6 - 2 5 0, 1 9 9 2) 等が報 30 告されているにすぎない。

【り004】一方、洗剤用にプロテアーゼを応用する場 合、ケラチン等の不溶性タンパラ質に対しても良好に作 用する酵素が望ましいことが指摘されている(皆川甚: 繊消誌、第26巻、322頁、(1985))。 もちろ ん、この場合においてもカゼイン等の可溶性タンパク質 を強力に分解できなければならないことは当代である。 また、プロデアーゼを治療や浴床排水溝あるいは洗面化 粧台ドレインの先進剤に応用する場合では、40℃前後 の中温で充分な活性を保持し、かつ毛髪、粘などのケラ 40 干ンを強力に分解する能力が要求される。現代の洗剤お よび洗浄剤は、配合組成の関係からその5日がアルカリ 領域にあることから、配合する酵素はアルカリプロデア ーゼが最適である。

【ペペペラ】さらに、ケラチンを主要タンパや貸出する 毛製、副毛等は化学合成が不可能なアミノ酸であるシア ディンの製造原料として重要である。現代では毛髪等を 酸加大分解処理し、化学的反応によりシステインを製造 している。しかしながら、過激な反応条件のため菩薩の レステェンが分解されてしまい、収量が極めて思いた (発用の属する技術分野)本発明は、新規なアルカリブ 63 め、プロデアーゼ也理等の温和な知光分解方法が望まれ

ていた。この場合においても、ケラチンが高アルカリ領 域において御閥し酵素の作用を受けやすくなるという性 質から、加キサ解剤としての酵素はアルカリプロデアー ゼが最適である。

【0006】 このような用途に対して 先述のAH-1) 1 株および好アルカリ性ストレプトミセス属菌由来の アルカリプロテアーゼの有用性が提案されている。しか しながら、特にケラチンの分解力において両酵素ともそ の実用化に対しては下充分であり、さらに強力なケラチ ン分解力を有する新規なアルカリプロデアーゼの開発が 10 望まれていた。

【り0077】 と記のような観点から、発明者らは強力な たうチン分解力を有するアルカリプロデアーゼを生産す る微生物を主に好アルカリ性放線菌を中心として検索し た結果、好アルカリ性のストレプトミセス属に属する放 線菌1株が、好気的培養により目的とする新規アルカリ プロテアーゼを功率良く生産することを見い出し、本発 明を完成するに至った。

[00008]

【発明が解決しようとする課題】したがって本発明は、 特にケラチンのような不溶性タンパク質をも強力に加水 分解できる、新規なアルカリプロテアーゼを提供するこ 上を目的としている。

【いり09】また本発明は、上記アルカリプロデアーゼ を生産する新規微生物およびその微生物を利用した上記 アルカリプロテアーゼの製造法を提供することを目的と している。

(00101

【課題を解決するための手段】本発明による新規アルカ もい、である。

【0011】(a)作用および基質特異性、各種タンパ 存質およびペプチドに特異的に作用し、そのペプチド結 台をエンド型の機作により切断して、低分子量のオリゴ ペプチドおよびアミノ酸を生成する。また特に従来のブ ローアーゼでは分解が困難であったケラチンなどの不溶 性タンパク質についても高い活性を示す。

- io) 最適;H:最適;Hはカゼインを基質とした場。 食、11.0~11.5である。
- (よ)安定をH:30℃、24時間の処理条件におい T. pH1. 5~12. 0で安定である。
- 11) 最適温度:最適作用温度は70~75℃である。
- (a) 灰定温度:pH7.0.10分間の処理条件にお いて、カルジウム無折地に場合は53℃、カルンウムを 添加した場合は60℃まで変定である。
- (:1 分子量:約36、000(SDS電気泳動法)で ある.
- 15に 等電点:約10~10、5(等電点電気泳動法)

である。

(h) 比話性 カゼインを基質とした場合は214.0 0 % (UVm a タンパク 、ケラモンを基質とした場合 はこ2、70)(U/mgタンパク)である。

4

() 阻害:PGMB (オラグロロマージュリーペング エイト)、ヨード酢酸、EDTA(エチレンジアミ、四 酢酸 では活性は阻害されないが、DFP (ジイソプロ ピルフルオロホスフェート)、 PMSF (フェニル <タ シスルフォニルフルオライド)では阻害される。

【0012】また、本発明による上記新規アルカリプロ モアーゼの製造法は、好アルカリ性ストレプトミセネ属 に属し、上記アルカリプロデアーゼ産生能を有する激生 物を培養する工程と、設工程で得られる培養物より設新 規アルカリプロデアーゼを分離する工程を含んでなるも の。である。さらにまた、本発明による上記新規アルカ リプロテアーゼ産生能を有する新規菌株は、ストレプト ミセス エスピー TOTO-9305株 (FERM F-13640) である。

【0013】 本発明によるアルカリプロデアーゼは比括 20 性が極めて高く、特に従来のプロデアーゼでは分解され にくかったケラモン等の不溶性タンパク質をも、強力に 如本分解する。したがって、玄料用洗剤や柔軟剤に洗浄 功果を高める目的で配合されたり、浴槽、浴室排水溝、 売面化粧台ドレインなどの閉塞除去剤に添加されれば、 極めて効果的である。さらに、ケラチンを主要タンパク 質とする毛髪、羽毛等からのシステインなどのアミノ酸 製造にも応用が可能であり、広範囲の工業分野で利用さ れ得る。また、本発明による菌株は、上記アルカリプロ テアーゼを効率良く菌体外に分泌するので、簡便な工程 リプロテアーゼは、以下のような理化学的性質を有する。30 て高効率にその生産を行うことができる点で有利であ

【0014】<u>新規アルカリプロテアーゼ</u>産生菌株

本発明による新規アルカリプロデアーゼは、微生物を用 いて生産することができる。特に好ましては、本発明に よるアルカリプロテアーゼは、好アルカリ性ストレプト ミセス属、特にストレプトミセス エスピー (Stre ptomycell sp.) TOTO-9305株によ り生産される。この菌株は発明者らにより、北九州市の 一般家屋浴室のタイル目地上より分離されたものであ

40 る。この菌性は好アルカリ性放線菌であり、次の表1及 び長こに示す菌学的性質を有する。なお、本菌株は好ア 2. か「微生物であり、通常の中性培地では生育しない が、あるいは生育が極めて不良であるため、表1及び表 20個学的性質の検討に際しては0.5%Na2CO3 活 知のアルカリ性培地を用いた。

[(015]

【表1】

蓄学的籍性質

路 性 質	TOTO-9305 捺				
形態	9				
1) 粒子形成菌糸の分枝佐および形態	吳純分枝,直状				
2) 胞子の連鎖数	10 胞子以上(10~50 胞子)				
3) 胞子の表面構造及び大きさ	平槽: 1.0 μm × 0.5 μm				
4) 鞭毛の有無	無				
5) 胞子のうの有無	無				
6) 胞子柄の着生位置	気菌糸上				
生想的性質					
1) 生育温度範囲 / pH	15~45℃ / pH 7.5~13				
2)ゼラチンの液化	少々する(4日で核化する)				
3) スターチの加水分解	加水分解する				
4) 脱脂牛乳の髪圖およびペプトン化	要固しない:5日でペアトン化する				
5)メラニン接色署の生成	生成しない				
各炭素源の同化性					
コンニアラビノース	+				
2) 5-キシコース	+				
3) コーグルコース	+				
4) ンフラクトース	+				
5) シュクロース	+				
6)イノシュール	÷				
7) に ラムノース	÷				
8) ラフィノース	+				
9) D-マンニット	+				

【表2】

各培地における生育状況

			集落表面	基生	菌糸	基生菌糸		
培 地 ,	生	Ħ	の菌色	の色	(表)	の色(裏)	拡散色素	その他
シュチロース硝酸塩寒天培地	良	好	ė	無	<u> </u>	無色	薄肌色	
ダルローストアンパラギン療天培地	良	好	ė	無	<u>&</u>	無色	なし	
が計りンプスパラギン窓交着地	艮	好	Ė	無	色	無色	なし	
スナ·無機塩寒天培地	良	好	É	無	<u>e</u>	無色	彈茶色	
チロシン業天培地	良	好:	a	無	<u>e</u>	無色	薄茶色	メラニンなし
栄養寒天塔地	良	57	a	無	e	無色	なし	
仁 以·麦芽寮天培地	良	好	Ė	Ħ	2	無色	なし	
北−トミナ等天培地	奂	\$ 7	自	無	<u>e</u>	無色	深肌色	

【0016】本菌株TOT3-9305株は表1の結果 有する。また、細胞壁にレーレージアミノピメリン酸を 含有する等のことがら、お勧株はストレプトミセス属に 属する一菌種と分類される。

【0017】TOTO=サ305株は、各種寒天培地上 での気菌糸の色調から白色シリーズに属すること、胞子 表面は平滑であること、胞子の連鎖はおおむね直状であっ ること、メラニン色素は出立しないこと等の性質を有す。 る。これらの性質と各種別差別の同化性試験の結果をも とに、既知菌種の中から本菌株の類の種をバージェーズ

of Determinactive Bacteri より、形態学的に放線菌、ストレプトミセス属の特徴を 40 ology 8th Ed.)に従って検索を行った。 その結果、特に各種炭素源の同化性において本菌株と類 似の既知菌種は見いだせないことから、本菌株はストレ プトミセス属に属する新菌種である。

> 【0018】なお、本菌株は工業技術院生命工学工業技 调研究所に寄託番号第13640号(FERM P-1 3640) のもと寄託されている。

【0019】培養条件

上記菌株は好アルカリ性放線菌であるため、その培養は アルカリ領域で行う必要がある。培地をアルカリ性にす マニュアル第8級 ${\tt VB}$ ${\tt PS}$ ${\tt PS}$ ${\tt PS}$ ${\tt PS}$ ${\tt PS}$ ${\tt PS}$ るための方法としては格別である必要はなく、通常の培

地中に例えば炭酸オトリウムあるいは炭酸水素ナトリウ ムを添加するだけで良い。炭素原としてはゲルコース、 可含性デンプン。セルロース等の単糖、多糖なビを用い ることができる。窒暑原としては、硝酸塩、アンモニが || 白塩なビの無機物をはじめ、尿素、ベブトン、乾燥酵| 母、酵母エキス、ダイズ粉、コーンスチープ(カー、カ ゼイン、肉ニキス、アミノ酸などが用いられる。これら の美素原や窒素原の他に各種無機塩、例えばマザネシウ ム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、コン酸塩などを必要 に応じて添加しても良い。培地に加えるアルカリ源とし ては、り、玉~2、0%程度の実酸十トリウム、炭酸水 素サトリウム等の炭酸塩あるいは水酸化ナトリウム、ア シモニアなどが使用でき、培地のpHはも、り~11 0程度が望ましい。

【りり20】培養は、このような培地中で培養温度20 ~40℃、好ましくは27~38℃で2日~5日間好気 的に挽殺または振とうしながら行う。

【0021】本発明による新規なアルカリプロデアーゼ は、上記のような培養条件のもとで、主として培養液中 に分泌され、蓄積される。

【0022】醛素の採取

上記培養液から本発明による酵素を採取、精製するため には、既知の精製法を単独もしくは併用して利用するこ とができる。本酵素は主として菌体外(培養液中)に分 泌されるため、例えば濾過あるいは遠心分離で菌体を除 去することにより容易に粗酵素液を得ることができる。 この粗酵素は、さらに既知の精製法、例えば硫安などに よる塩折:メタノール、エタノール、アセトンなどの有 機溶媒による沈殿法:ケラチン等による吸着法、限外適 グラフィー: 疎水クロマトグラフィー、その他の各種ク ロマトグラアルーを、単独もしては併用して、精製する ことができる。

【1003】好ましい精製法を示せば以下の通りであ る。まず、培養總液に50%飽和硫安を添加して塩炉を 行い、得られた沈殿を緩衝液に溶解する。次いでCM= Toyorbarl 650Mi東"一社製り、DEA E=Tのサンチャカエ、- らるりM (同社製) によるイ オン交換グロマ、グラフィーを行うことにより、SES 電景所動的に均一な精製酵素を得ることができる。

【「リコリ】酵素の性質

本発明によるアルカリプロデアーゼの性質は以下に予さ れる通しである。なお、以下において活性測定法とは次 の方法をいうものとする。

【中・2~】(活性測定法)カゼイン)、ら為またはケ ラモナ2%を含む50mMグリンンに101/NaOH 緩衝波(4日10.5) 0.5m1を).1m1の酵素 溶液と混合し、30℃、10分間(ケラチンを基質とし た場合は板とうしながら2)外間に反応させた後、2。 この、のトリダロロ酢酸混合液、で、11Mトリダロロ、10、 本酵素の化子量を303種気逐動法により測定したとこ

酢酸、0 2.2 M酢酸ナトリウム、)、 3.3 M酢酸) を 加えて30℃で3○子間静置した仮。アドバンテック社 製造紙No:50で推過する。たいで、この想波のc 5 m 1 を 2 - 8 m - ふ 0 、 5 M 世襲 十トリウム溶液に加 え、さらに3倍角积したフェノール試薬を()、5m1添 加撹稈後。さらに怪温にて30分間放置し、660cm の吸光度を測定する。上記の測定条件下で1分間に1マ イフログラムのチロシンに相当する吸光度を増加させる 酵素量を、酵素活性1単位(10)と定義する。

3

【ロのこ6】 1)作用および基質特異性 カゼイン、ゼラチン、ゲルテン、ヘモプロビン、インジ ュニンなどのタンパで質に作用し、そのペプチド結合を エンド的に加水分解することによりすりゴバブチドおよ びアミ (酸を主成する)また、特に従来の酵素では分解 の困難であったケラチンなどの不溶性タンパク質をも強 力に加水分解する。

【0027】 (2) 最適り日および安定り日 上記の活性測定法にもとづき、本酵素に及ぼすり日の影 響を調べた。なお、緩衝液としてNCI、HCI(pH 20 1 0-1 5). MUL > NaC | HC | (pH 2 0-3:5)、酢酸(pH4:0-5:5)、リン 酸 (pH6: 0=7: 6)、おり因、HC: (pH7: 5-8, 5) , MUDDNaCl/NaOHopH9. 3. り)を使用した。第1回に活性の最大値を100と した場合の各りHにおける相対活性を示した。第1図に より本酵素の最適り日は30℃において11.0-1 1. 5であることが分かる。

【りり23】同様に本酵素のpH安定性について第2因 過:ゲル濾過クロマトグラフィー;イゴン交換クロマト、30、に示した。本酵素を各pHの緩衝液中に30℃で24時 間保持した後、その残存活性を未処理の酵素活性を10 りとした相対活性として示した。第2回から、本酵素は 上記処理条件下においてを目1、5-12、0までの極 めて広範囲のpH软で安定であることが分かる。

> 【0029】 (3)最適温度および安定温度 上記活性測定法に進じて、本酵素に及ぼす温度の影響を 調べた。第3図に最出活性を100とした場合の各温度 における相対活性を当した。第3回から、本酵素の最適 温度はアループがしてあることが分かる。

- 【中り30】また、本酵素を50mMトリス塩酸緩衝液 4.0 (ガH7 り)に活知し、40~80℃の範囲の各条件 下で10分間保持した後、その残存活性を測定した。測 定は5mMの塩化カルシウムを添加した場合としない場 台の二通りについて行った。その結果を第4回に示し た。第4回により、カルシウム無添加の場合は55℃ま で、カルシウムを添加した場合はもりでまで安定である。 ことがわかる。この結果より、本酵素はカルシウムの添 加により熱安定性が増加することが判明した。

【 】 0 3 1 】 (4) 分子量

特開平9-121855

10

る、分子量は約36、り00であった。

【0032】(5)等電点

本酵素の等電点を等電点電気泳動法により測定したとこ 3、準電点は約10~10.5であった。

【0.33】(6)比活性

本酵素の比活性を活性測定法に準じて測定した。なお、 タンボン質濃度はバイオラッド社製のプロデインアッセ イキットを使用して測定し、酵素は電気泳動的に均一な 精製標品を使用した。その結果、本酵素の比括性は、方 ゼインを装質とした場合は2.1.4,000(U/mgタ 10 ンパウ』、ケラチンに対しては52,700(ゼノmg タンパクーであり、本酵素は極めて強力な加水分解活性 を有することが判明した。

【0034】 (7) 阻害

一般的な酵素阻害剤であるDFP(ジイソプロピルフル オロボスフェート)、PMSF (フェニルメタンスルフ ォニルフルオライド)、PCMB (パラクロロマーキュ リーパンプエイトI、ヨード酢酸、EDTA (エチレン ジアミン四酢酸)、SDS(ドデシル硫酸ナトリウム) について、これらが本酵素の活性に及ぼす影響を調べ た。各阻害剤を所定濃度となるように50mMトリス塩 酸緩衝液(pH9.0)に溶解し、本酵素を添加後30 **むで30分間処理を行った。次いで処理溶液より一定量** を分取して活性測定法に準じて、その残存活性を測定し た。残存活性は阻害剤無添加で同様に処理した対照を1

00とした相対値で示した。この結果を表3に示した。 [0035]

【表3】

各種阻害剤の影響

型害剤	濃度	残存居性
対照	無添加	100
DFP	lmM	0
PMSF	lm M	0
PCMB	lmM	91
ヨード酢酸	lmM	96
EDTA	lmM	91
SDS	0.2%	74

【0036】表3の結果から、本酵素はDFPおよびP MSFにより阻害され、その他の阻害剤による阻害を受 けなかったことより、本アルカリプロテアーゼはセリン プロテアーゼであることがわかる。また、本酵素は界面 活性剤であるSDSに対しても若干の阻害をうけたもの の、まだ十分な活性を保持しており洗剤用として有望で 20 ある。

【0037】上記各特性を示す本酵素と、従来公知の細 菌、放線菌由来のアルカリプロテアーゼとの比較を表 4 に示した。

[0038]

【表 4 】

各種アルカリプロテアーゼの比較

酵素名または	本発明	生化学工業		すつ・チリシン	サフ・チリシン	ナブ・テラジン	ニラスターセ・
整株名	T0TC-5305	78917' 197-4'	AH 101	B. smotilis	BPN'	Carlsberg	Ya-B
分子量	56,000	50.000	29,000	22,700	27,700	27,600	23,700
等電点	10.0-10.5	8.7	9.2	7.5-8 0	7.8	9.8	10.6
最適のH 対"心	11.0-11.5	12-13	12-13	10.5	10.5	10.5	11.75
ケラチン	> 13		11-12				
最遊漢度(℃)	70-75	60	70	55		50	60
比活性 まだか	214,000	3,624	2,500	2,300	2,200	6,500	12,400
(Umgt/m 1) 4752	52,700		3,970		436	988	
文献		1,2	3	9	3	3	3

空間は該当データなし。

文献 - 1 : Agr. Biol. Cham., 38, (1) 37-44, 1974.

2; エンダイム データ シート ライプラター (生化学工業株式会社)

3 ; ^ (オサイエンスとインチ ストリー 48, (7) 33-36, 1990.

【(1)3月】表4に示した諸性質の比較より、本酵素が 極めて高い比活性を有する新規なアルカリプロテアーゼ であることが分かる。

(0040)

【発明の実施の態様】次に本発明を以下の実施例により 更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるも のではない。

【〔〕41】 実施例1 租酵素粉末の調製

前培養液50m!(35℃、4日間振とう培養)を、可 溶性デンプン1.5%、スキムミルク1.5%、K2H CO4 0.3%、酵母工丰久0.1%、MgSO4· 7 H 2 O 0 . 0 5 % および 別殺菌して添加したN a H CO3 1.0%を含有する培地(pH9.0)450 ①m.を入れた小型ジャーファーメンターに植菌し、3 5℃で4日間、通気量1 v / v / m i n 、回転数200 rpmで培養を行った。培養終了後、培養液を8000 ストレプトミセス。エスピー、TOTOT9303件の「5)「rpmで10分間適心分離して菌体を除去した。得られ 1

た上緯液を凍結乾燥して、40U/mgの粗酵素粉末9gを得た。

【0042】実施例2 精製酵素の調製

集施例よど同様の培地4300mlを入れた小型ジャーファーメンターに、ストレプトミセス。エスピー。TOTO-9305株の前培養液を0mlを植菌した。これを実施例1と同様に培養した後、遠心分離により培養上待3500mlを得た。この上清液のpH10.5におけるプロテアーゼ活性は94.5U/mgであった。

活性画分を透析後、1mMCaClを含む10mMトリス塩酸緩衝液(pH9、0)で平衡化したDEAE-TCyopeari 350Mカラムに通じて活性画分を通過させ、不純タンパク質を吸着させた。上記一連の精製により、1920で/mlのアルカリプロテアーゼを34ml得た。本画分はSDS電気泳動的にもゲル濾過的にもそれぞれ単一パンドおよび単一ピークを示し、酵素タンパク質として均一であることが確認された。

1.2

【図面の簡単な説明】

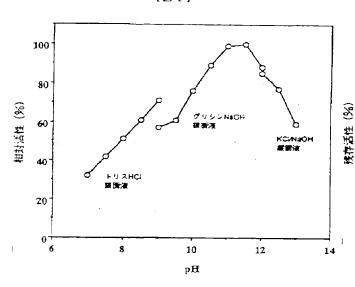
) 【図1】図1は、本発明によるアルカリプロデアーゼの 最適p日を示すグラフである。

【図2】図2は、本発明によるアルカリプロデアーゼの 安定pHを示すグラフである。

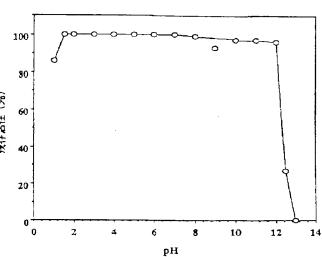
【図3】図3は、本発明によるアルカリプロデアーゼの 最適温度を示すグラフである。

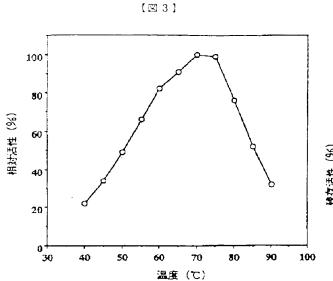
【図4】図4は、本発明によるアルカリプロテアーゼの 安定温度を示すグラフである。

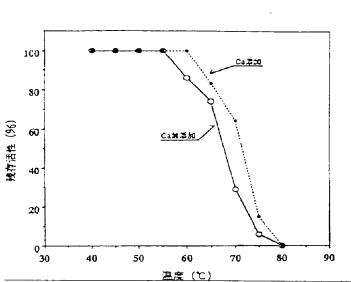
[図1]



[2]2]







[図4]

フロントページの統き

(5!) Int. CI. 6 識別記号 庁内整理番号 F I

技術表示箇所

(72)発明者 村野 仁美

C12R 1:465)

福岡県北九州市小倉北区中島二丁目1番1

号 東陶機器株式会社内

(72)発明者 大崎 有美

福岡県北九州市小倉北区中島二丁目1番1

号 東陶機器株式会社内